A. H. Egg, E. Kubli und **P. S. Chen.** — Zum Stoffwechsel der tRNS beim Wildtyp und der Letalmutante *1(3)tr* von *Drosophila melanogaster.* (Mit 1 Textabbildung und 3 Tabellen) [1]

Zoologisches Institut der Universität Zürich, CH-8006 Zürich.

Abstract

Transfer RNA metabolism in the wild-type and in the lethal mutant 1(3)*tr* **of** *Drosophila melanogaster.* — The aminoacylation of tRNA from the lethal mutant *1(3)tr* and the wild type of *Drosophila melanogaster* has been determined by an *in vitro*-system. The charging capacity was found to be about 37% lower in the 4-day-old lethal larvae than in the corresponding normal individuals. In lethals aged 6 days even a reduction of about 75% was observed. Experiments on aminoacylation of the initiator $tRNA_f^{Met}$ and highly purified $tRNA^{Asp}$*Q yielded the same results. The fact that the incorporation of ^{14}C-ATP into the 3′-end of tRNA is two times higher in the mutant than in the wild-type suggests that the terminal -C-C-A of the tRNA molecule in the lethal larvae may be defective. The significance of deacylated tRNA in this lethal mutant is discussed.

Einleitung

Die homozygoten Larven der Mutante „*letal-translucida*“ *(1(3)tr)* von *Drosophila melanogaster* unterscheiden sich von denjenigen des Wildtyps durch eine übermässige Ansammlung von Hämolymphe, eine um 24 Stunden verzögerte Pupariumbildung und eine gehemmte Fettkörperentwicklung. Die meisten Individuen bleiben in ihrer Entwicklung nach der Verpuppung stehen, und nur in seltenen Fällen wird eine partielle Metamorphose im Thorax- und Kopfbereich verwirklicht (Hadorn 1961; Chen 1971).

Biochemisch ist die Letalmutante gekennzeichnet durch einen stark erhöhten Gehalt an Ninhydrin-positiven Substanzen, vor allem Aminosäuren, in der angereicherten Hämolymphe, wogegen der Gehalt an Proteinen reduziert ist (Gloor 1949; Chen 1956, 1959). Gegenüber dem Wildtyp ist die RNS- und Proteinsynthese verzögert (Weinmann 1964; Weideli 1971).

In der vorliegenden Arbeit befassten wir uns mit der Aminoacylierung der tRNS. Bei diesem Prozess wird die entsprechende Aminosäure an eine spezifische tRNS enzymatisch übertragen. Im weiteren wurde untersucht, ob das allen tRNS gemeinsame 3′-terminale -C-C-A Ende in intaktem Zustande vorliegt. Fehlt das endständige Adenosin, so kann die Aminosäure nicht mehr an die tRNS gebunden werden. Dies könnte eine Ursache für gehäuftes Auftreten von deacylierter tRNS sein, was eine Erklärung für die reduzierte Proteinsynthese bei der *1(3)tr*-Mutante sein könnte.

[1] Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaflichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Im folgenden fassen wir einige wesentliche Ergebnisse zusammen, da es sich um eine vorläufige Mitteilung handelt. Die Einzelheiten sollen in einer späteren Publikation veröffentlicht werden.

Material und Methoden

Die Larven des Wildtyps waren aus dem Stamm „Sevelen" von *Drosophila melanogaster*. Die Larven der Mutante „*letal-translucida*" gingen aus einer Kreuzung der zwei balancierten Stämme ♀ *(1(3)tr Ubx*^{130}*, TM*$_1$*, Mé ri sbd*^{1}*)* und ♂ *(1(3) tr Sb/In (3L)P + (3R) P1. Mé Ubx*^{130}*, e*^{4}*)* hervor. Aus dieser Kreuzung entstehen nur *1(3)tr/1(3)tr* homozygote Larven. Alle andern Genotypen sind weitgehend embryonal letal. Zwei bis vierstündige Gelege der beiden Genotypen gelangten in Zuchtflaschen auf Standardfutter (Mais-Zucker-Hefe-Agar) bei 25° C zur Entwicklung. Im Alter von 4 und 6 Tagen wurden die Larven mit einer 20% Saccharoselösung aus dem Futter herausgewaschen und im Scheidetrichter von Futterüberresten gereinigt.

Die tRNS wurde nach der Methode von Kirby (1956) extrahiert. Die Reinigung der tRNS erfolgte mittels DEAE-Cellulose nach Kelmers *et al.* (1965) und Gelfiltration mit Sephadex G-100 (White & Tener 1973). Die Isolation der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen geschah nach der Methode von Twardzic *et al.* (1971). Das gereinigte Material wurde in Trispuffer (pH 7,4) in 50% Glycerin gefroren aufbewahrt. Für die *in vitro*-Aminoacylierungen entsprachen die Konzentrationen der einzelnen Komponenten den Angaben von White & Tener (1973).

Die Isolation des Isoakzeptors $tRNS^{Asp}$*Q wurde nach dem Verfahren von Okada *et al.* (1977) durchgeführt. Bei den Untersuchungen des 3'terminalen -C-C-A Endes der tRNS wurden die Isolationsmethode und das *in vitro*-System für Nukleotidyltransferasen von Deutscher (1974) übernommen, wobei das Enzym etwa 1000-fach angereichert werden konnte.

Resultate und Diskussion

Die tRNS aus Wildtyplarven kann mit 791 pM/OD_{260}, die tRNS aus 4-tägigen Letallarven mit 500 pM/OD_{260} aminoacyliert werden (Tabl. 1). Die Aminoacylierung der tRNS aus den beiden Genotypen wurden in einem *in vitro*-System nach Angaben von White & Tener (1973) durchgeführt, wobei anstelle des Tris-HC1 Puffers ein Phosphatpuffer gleicher Molarität und gleichem pH verwendet wurde. Die beobachteten Werte liegen im Rahmen der mit dieser Methoden zu erwartenden Inkorporationsmengen, obwohl sie nur rund 50% des theoretisch erreichbaren Wertes von 1600 pM/OD260 darstellen. Jede der für 20 Aminosäuren getesteten tRNS aus den Letallarven ist in der Akzeptorfähigkeit reduziert. Diese Reduktion nimmt mit der Entwicklung der Letallarven stark zu und beträgt bei 6-tägigen Larven rund 75%. Im gleichen Ausmasse bewegt sich auch die reduzierte Beladbarkeit für die Initiator $tRNS_f^{Met}$ (Tab. 2). Dieser Isoakzeptor wird exklusiv beladen mit *E. coli* Aminoacyl-tRNS-Synthetasen (Nygard & Hultin 1976).

Nach Torres-Gallardo & Kern (1965) können RNS-Abbauprodukte inhibitorische Effekte auf die Aminoacylierungsreaktion ausüben. Deshalb war es wünschenswert, unsere Aminoacylierungsexperimente mit einem gereinigten tRNS-Isoakzeptor durchzuführen. Die Isolation des Isoakzeptors $tRNS^{Asp}$*Q gelingt aufgrund des Hexosegehaltes der Base Q, die an erster Stelle im Anticodon steht. Mittels einer Concanavalin A-Sepharosesäule, welche spezifisch Glucose und Mannose bindet, kann dieser tRNS-Isoakzeptor aus *Drosophila* rein dargestellt werden. Die Aminoacylierung der auf diese

TABELLE 1

Aminoacylierung von tRNS aus beiden Genotypen. Angaben in pMol/OD^{260}.

Aminosäure	+/+	4d 1(3)tr	%	6d 1(3)tr	%
Alanin	58	36	63	18	31
Arginin	50	31	62	12	24
Asparagin	25	20	75	7	39
Asparaginsäure	48	22	46		
Cystein	16	13	81		
Glutaminsäure	28	21	75		
Glutamin	21	17	81		
Glycin	91	67	77	30	33
Histidin	31	24	77	7	23
Isoleucin	38	20	53		
Leucin	31	17	55		
Lysin	31	24	77	10	32
Methionin	35	26	74		
Phenylalanin	52	29	56	12	23
Prolin	24	14	60		
Serin	60	40	67	23	38
Threonin	48	28	58	11	23
Tryptophan	48	22	46		
Tyrosin	16	8	50	4	25
Valin	65	41	63	31	48
Gesamt pMol/ OD 260	791	500	Ø 63		
^{14}C-Proteinhydrolysat cpm/OD 260	34530	21756	63		

TABELLE 2

Beladung der tRNS$_f^{Met}$ (Initiator-tRNS) mit E. coli Synthetasen

tRNS	+/+	1(3)tr	%
Total (tRNS$_m^{Met}$ + tRNS$_f^{Met}$)	35	26	74
tRNS$_f^{Met}$	28	21	75
Prozentualer Anteil an Initiator tRNS	80	81	

Weise isolierten tRNS^{Asp} aus den beiden Genotypen (Wildtyp 840 pM/OD_{260}; Mutante 730 pM/OD_{260}) bekräftigt obige Befunde, indem auch mit reiner tRNS die Acylierbarkeit vermindert ist (Abb. 1). Die Beladbarkeit für die tRNS^{Asp} aus der Letalmutante beträgt hier 87%.

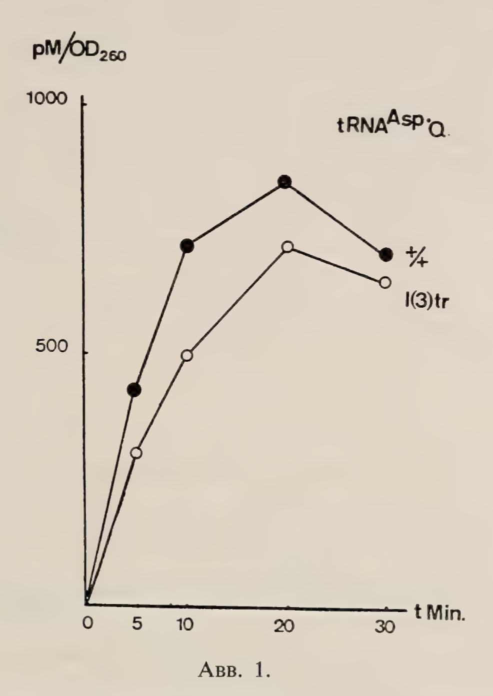


ABB. 1.

Verlauf der Aminoacylierungskinetik der tRNS^{Asp}*Q aus den beiden Genotypen.

Da es sich bei der reduzierten Aminoacylierbarkeit der tRNS aus der Letalmutante wahrscheinlich um einen allgemeinen Effekt handelt, lag es nahe zu untersuchen, ob das 3′-terminale -C-C-A Ende in intaktem Zustande vorliegt. Die Resultate (Tab. 3) zeigen, dass sich beim Wildtyp in rund einen Achtel der Total-tRNS ein radioaktives

TABELLE 3

^{14}C-ATP-Einbau in tRNS verschiedener Herkunft. Die Mittelwerte wurden aus 3-5 Versuchen berechnet.

Puffersystem:

	pH 9,4	pH 9,4 + 0,5 mM CTP
tRNS-C-C	897 pM/OD_{260} ± 23	908 pM/OD_{260} ± 17
tRNS 1(3)tr	390 pM/OD_{260} ± 21	410 pM/OD_{260} ± 13
tRNS +/+	198 pM/OD_{260} ± 7	202 pM/OD_{260} ± 7

Adenosin inkorporieren lässt. Die entsprechenden Werte für die tRNS aus der Letalmutante sind doppelt so hoch. Folglich weisen rund ein Viertel der Total-tRNS Moleküle ein defektes -C-C-A Ende auf.

Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die tRNS aus der Letalmutante *l(3)tr* in der Aminoacylierung reduziert ist. Zur gleichen Feststellung gelangte auch Kubli (1978) bei der Letalmutante *l(2)me* von *Drosophila melanogaster*. Aehnliche Resultate erhält Hosbach (1977) in seinen Untersuchungen über die Beladbarkeit der tRNS während des Alterns der Adultfliegen. Inwieweit deacylierte tRNS die Leistung der Proteinsynthese erniedrigt, ist allerdings nicht im Detail aufgeklärt und quantitativ erfasst worden. Gut untersucht ist die Bedeutung deacylierter tRNS für die Proteinsynthese bei *E. coli* und in Reticulocyten (Cashel & Gallant 1969; Grummt & Grummt 1976). Durch Entzug einer essentiellen Aminosäure aus dem Nährmedium kommt es zur Bildung deacylierter tRNS und dadurch zum Zusammenbruch der Proteinsynthese. Ob die fehlenden intakten -C-C-A Enden der tRNS aus der *l(3)tr*-Mutante die einzige Ursache für die reduzierte Aminoacylierbarkeit darstellen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Eine endgültige Antwort erbringen erst Untersuchungen über den Modifikationsgrad der tRNS.

LITERATURVERZEICHNIS

Cashel, M. and J. Gallant, 1969. Two compounds implicated in the function of the RC Gene of *E. coli. Nature* 238: 838-841.

Chen, P. S. 1956. Elektrophoretische Bestimmung des Proteingehaltes im Blut normaler und letaler Larven von *Drosophila melanogaster. Revue suisse Zool.* 63: 216-229.

— 1959. Trennung der Blutproteine von *Drosophila melanogaster* und Culexlarven mittels Stärkegelelektrophorese. *Revue suisse Zool.* 66: 280-289.

— 1971. Biochemical aspects of insect development. In *Monographs in Developmental Biology* 3. Karger Basel.

Deutscher, M. P., 1974. tRNA and enzymes acting on tRNA. *Meth. Enzym.* 29, 706-716.

Gloor, H. 1949. Biochemische Untersuchungen am Letalfaktor *letaltranslucida (ltr)* von *Drosophila melanogaster. Revue suisse Zool.* 56: 281-285.

Grummt, F. und I. Grummt, 1976. Studies on the role of uncharged tRNA in pleiotypic response of animal cells. *Eu. J. Biochem.* 64: 307-312.

Hadorn, E. 1961. Developmental genetics and lethal factors. *Methuen, London.*

Hosbach, H. 1977. Vergleich der Aminoacylierung und der Isoakzeptormuster der tRNA junger und alter Fliegen von Drosophila melanogaster. *Dissertation, Universität Zürich.*

Kelmers, A. D., G. D. Novelli, and M. P. Stulberg, 1965. Separation of transfer ribonucleic acids by reverse phase chromatography. *J. biol. Chem.* 240: 3979-3983.

Kubli, E. 1978. Der Letalfaktor *l(2)me* von *Drosophila melanogaster*: eine Deletion für tRNA Gene? *Revue suisse Zool.* 85: 790-795.

Kirby, J. D. 1956. A new method for the isolation of ribonucleic acids for mammalian tissues. *Biochem. J.* 64: 405-408.

Nygard, D. and T. Hultin, 1976. Separation of Met-tRNA and Met-$tRNA_f$ by chromatography on Sepharose 4B columns. *Prep. Biochem.* 6: 339-346 (1976).

Okada, N., N. Shindo-Okada, and S. Nishimura, 1977. Isolation of mammalian $tRNA^{Asp}$ and $tRNA^{Tyr}$ by lectin sepharose affinity column chromatography. *Nucl. Acids Res.* 4: 415-423.

Torres-Gallardo, J. and M. Kern. 1965. The specific inhibition of the enzymatic amino-acylation of valyl- and tyrosyl-sRNA by periodate-oxidized sRNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 53: 91-97.

Twardzic, D. R., E. H. Grell, and K. B. Jacobson, 1971. Mechanism of suppression in *Drosophila:* A change in tyrosin transfer RNA. *J. molec. Biol.* 57: 231-245.

Weideli, H. 1971. RNS-Stoffwechsel und Proteinsynthese in einem zellfreien System des Wildtyps und der Letalmutante „*1 (3)tr*" von *Drosophila melanogaster. Molec. Gen. Genetics* 112: 167-169.

Weinmann, H. P. 1964. Untersuchungen mit markierten Aminosäuren zum Proteinstoffwechsel normaler und letaler Genotypen von *Drosophila melanogaster. Z. vergl. Physiol.* 48: 429-461.

White, B. N., and G. M. Tener, 1973. Chromatography of *Drosophila* tRNA on BD-Cellulose. *Can. J. Biochem. Physiol.* 51: 896-902.

H. Ineichen. — Photoperiodische Kontrolle der Entwicklung von *Chironomus tentans* und entwicklungsspezifisch Puff - Veränderungen (*in vivo* und *in vitro*)

Institut für Zellbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Schweiz

Abstract

Photoperiodic control of the development of *Chironomus tentans*; **development specific puffing changes,** *in vivo* **and** *in vitro.* — The development of imaginal discs shows that the photoperiod controls the course of development in the 4th larval instar of *Chironomus tentans.* Long-day induces subitaneous development; short-day treatment results in a dormancy (oligopause) for more than 150 days in the mid L_4. A subsequent switch to long-day terminates the dormancy, and the larvae resume the subitaneous development into prepupae. Dormancy and the prepupal stage are extreme contrasts in their morphogenetic activity. In general, puff frequency and size in different regions of giant chromosomes are depressed in dormant larvae. Particularly, the ecdysone-inducible regions BR 1 and I-18-C are completly unpuffed, unlike BR 2 and the juvenile hormone-inducible puff I-19-A . In prepupae BR 1 and I-18-C are maximally puffed.

When glands are incubated in ^{3}H-uridine for the autoradiographic demonstration of transcriptional activity it can be shown that the puffing pattern changes within 30 minutes. In oligopausing larvae, these changes are different from those observed with prepupal glands. Thus, the *in vivo* state of puffing is not always maintained during an *in vitro* treatment. Moreover, with oligopausing glands less cells incorporate ^{3}H-uridine than with prepupal glands.

Die Imaginalscheiben-Entwicklung im 4. Larvenstadium (L_4) von *C. tentans* stellt ein geeignetes Kriterium dar, um die Entwicklungskinetik unter verschiedenen Bedingungen zu definieren. Es zeigt sich, dass der Photoperiode Steuerfunktion für den Ent-